

# ウシガエル卵由来レクチン（リボヌクレアーゼ）の抗腫瘍作用

著者	岩間 正典
雑誌名	星薬科大学紀要
号	41
ページ	9-14
発行年	1999
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1240/00000100/">http://id.nii.ac.jp/1240/00000100/</a>

## ウシガエル卵由来レクチン（リボヌクレアーゼ）の抗腫瘍作用

岩 間 正 典

星薬科大学 微生物学教室

### Antitumour Action of a Lectin (Ribonuclease) from Bullfrog

Masanori Iwama

Department of Microbiology, Hoshi College of Pharmacy

#### 1. はじめに

RNA 分解酵素であるリボヌクレアーゼは、生物にとって RNA の代謝回転に必須の酵素であるのみならず、その一部には、RNA 分解活性に関係し、あるいは無関係に、多くの特異な生理活性を有するものがあることが知られている。*Aspergillus oryzae* 由来の RNase T2 に代表される RNase T2 family と呼ばれるリボヌクレアーゼ<sup>1)</sup>は、ウイルス、細菌、真菌から、植物、動物に至る全生物種に保存されていることが、我々を含む多くの研究グループの近年の研究で明らかとなった<sup>2)</sup>。この仲間には、ナス科、バラ科などの植物が受粉する際に、自己と同じ遺伝形質を持つ花粉管の伸長を止める自家不和合性因子 (S-RNase) が含まれている<sup>3)</sup>。また、同じく *Aspergillus oryzae* 由来の RNase T1 に代表される RNase T1 family と呼ばれるリボヌクレアーゼ類<sup>1)</sup>はグアニン塩基に特異的であり、真菌および細菌にのみ存在している。この仲間に含まれる  $\alpha$ -sarcin 等の真菌由来の細胞毒には腫瘍細胞の成長阻害が知られている<sup>4)</sup>。一方、もう一種類の代表的リボヌクレアーゼとして、ウシ臍臓の RNase A を代表とする RNase A family がある<sup>5)</sup>。この酵素はピリミジン塩基特異的であり、分子量 14,000 前後（アミノ酸 130 残基程度）と、タンパク質としてはかなり小さな部類に入り、安定であること、ウシ臍臓からは消化酵素として大量に得られることから、早くから極めて多くの研究がなされてきている。Beintema を中心とするグループが多くの哺乳類臍臓から同種酵素を精製し、次々と一次構造を決定したこともあり、現在では 100 を越える同種酵素の一次構造が決定されている。その一部について、Fig. 1 に一次構造を示した。RNase A family 酵素は研究が進むにつれてさらにいくつかのサブタイプに分けられることが分かってきた<sup>6)</sup>。最も多く知られているのは、哺乳類臍臓が分泌する、いわゆる分泌型といわれるタイプである。これに対し、肝臓や腎臓から非分泌型と呼ばれる酵素が見出された。この代表はヒト尿から見つけた RNase Us である<sup>6,7)</sup>。後にこの

RNase Us と全く同じ一次構造を有する酵素が、ヒト白血球から、eosinophyl derived neurotoxin (EDN) として見出され<sup>8)</sup>、同様酵素が他の数種の哺乳類から見つかっている<sup>9,10)</sup>。これらの酵素の最近の研究により、分泌型と非分泌型という名称が必ずしも適切ではなく、さらに種々の酵素が見出されることから、1 から 6 群に分類することが提唱されている<sup>11)</sup>。RNase A は 1 群、RNase Us は 2 群に分類される。この中で特徴のあるのは 5 群に分類されている血管新生に関与しているとされる angiogenin である<sup>12)</sup>。angiogenin は Riordan 等が精力的に血管新生作用の研究や、立体構造、改変体研究を進めている<sup>12)</sup>。この angiogenin は基質との結合部位に立体障害があることもあって、リボヌクレアーゼ活性は、ウシ臍臓の RNase A の 1/1000 以下に低下している。以上はいずれも哺乳類に広く知られているサブタイプである。哺乳類に特徴的なのは、それぞれのサブタイプあるいは同じサブタイプの酵素が同一種の同じ臓器に複数含まれていることが多いことであり、これは局在性の相違という以外に、本来の RNA 分解とは別に多様な機能を果たしていることが伺われる。哺乳類以外の脊椎動物では、ニワトリ<sup>13)</sup>、カメ<sup>14)</sup>、イグアナ<sup>15)</sup>そして数種のカエル<sup>16-19)</sup>からこの種の酵素が精製され、一次構造も決定されている。これら下等脊椎動物の RNase A family 酵素は、アミノ酸の相同性から計算すると、上記いずれのサブタイプにも属していないが、どちらかという angiogenin に近くなっている<sup>6)</sup>。極めて精力的に多くの研究がなされているにもかかわらず、RNase A family 酵素は、現在までに脊椎動物しかも両生類であるカエル以上からしか見つかっていない。このことは、タンパク質の分子進化という観点からも興味深いものであるが、Fig. 1 から明らかなように、RNase A family に共通に保存されているアミノ酸残基は比較的少なく、特に、遺伝子検索の際に必要な連続して保存されている領域がないことから、遺伝子データベースからの検索には現在まで成功していない。

RNase A family 酵素の内、2 つのグループに抗腫瘍

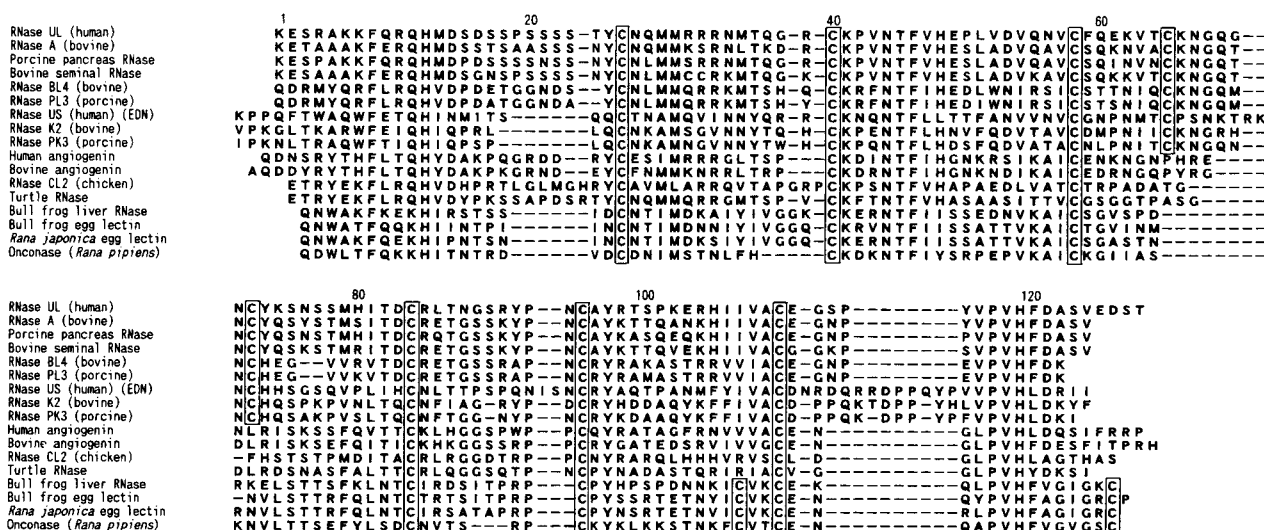


Fig. 1. Comparison of the amino acid sequences of RNase A family, ribonucleases. Half-cystine residues are enclosed by boxes. The numbers at the top of the matrix represent RNase A numbering.

作用があることが明らかになっている。その1つは、ウシ精嚢由来のRNaseである<sup>20)</sup>。ウシ精嚢RNaseはRNase Aと一次構造上約80%の相同性があり、酵素活性も類似している。この酵素は31, 32残基目に連続した2つのCys残基を有しており、この2つのCys残基が、隣接するもう1つのRNaseとの間で分子間架橋をしてホモダイマーを形成している。架橋した2分子の間では、N-末端部分が互いに入れ替わったいわゆる swapping の状態になり、他分子のペプチド鎖同士の間それぞれ活性中心を形成している。通常リボヌクレアーゼは一本鎖のRNAを分解し2本鎖部分はほとんど切らないが、ウシ精嚢リボヌクレアーゼは2本鎖RNAを良く切ることが知られている。このことと、2量体形成との関係は必ずしも明らかではないが、さらに特徴的なことは、ウシ精嚢リボヌクレアーゼは2量体状態のときに腫瘍細胞に入ってその腫瘍細胞を死滅させることが知られている<sup>21)</sup>。

抗腫瘍作用が知られているもう1種は、カエルから得られている<sup>21)</sup>。RNase A family としては最下等動物であるカエル由来のリボヌクレアーゼに抗腫瘍作用があること、酵素化学的性質面でも種々特徴的であることから、近年注目を集めている。本稿では、カエル由来酵素について、その諸性質並びに抗腫瘍作用について記述する。

## 2. カエルリボヌクレアーゼの特徴

現在までにカエルのリボヌクレアーゼは4種見出されている<sup>21)</sup>。その一次構造はFig. 1に示したが、4種は互いに一次構造上の相同性が高いが、他のRNase A family との相違は大きい。4種いずれも *Rana* 属に属するカエルで、3種は卵から、1種は肝臓から得られてい

る。カエルリボヌクレアーゼはアミノ酸約110残基からなる低分子量タンパク質で、その1つの特徴は100℃でも耐えられる耐熱性酵素であることである<sup>22)</sup>。カエルリボヌクレアーゼは、一次構造上C-末端付近にS-S結合をRNase Aより1組余分に持っているため、その分立体構造が安定化している。ウシガエル卵(卵母細胞)中には、0.1-0.3%の含量で本酵素が含まれており、主力酵素タンパク質といえる。おそらくは、受精の際に何らかの働きをすることを考えられているが、*Rana* 属以外のカエル、また他の動物の卵にはほとんど含まれてはおらず、その特殊性に興味を持たれる。

4種の内、ウシガエル肝臓のリボヌクレアーゼは、我々が一次構造を決定し、RNase A family に属するリボヌクレアーゼであることを明らかにした<sup>18)</sup>。本酵素は、リボヌクレアーゼとして以外の特別な生理活性作用は未だ見出されていない。

ウシガエル卵<sup>16)</sup>とアカガエル卵<sup>17)</sup>由来の酵素は、東北薬科大学の仁田等が見出した。本酵素はシアル酸結合レクチンとして見出され、一次構造が明らかになって初めて、リボヌクレアーゼであることが明らかとなった。本酵素は、シアル酸に結合することから、シアル酸結合糖鎖を有する受容体に結合して、細胞内に進入すると考えられており、仁田等によって各種腫瘍細胞の成長を阻害することが明らかとなった<sup>23)</sup>。

*Rana pipiens* 卵由来の onconase も同種酵素として見出された<sup>19)</sup>。本酵素は onconase という命名からも理解できるように、発見の当初から抗腫瘍作用が注目されていた。onconase の細胞内取り込みには、シアル酸の関与はなく、シアル酸結合レクチンとは異なった機構と考えられている<sup>21)</sup>。onconase はマウスでの動物実験により有効性が確認できたが、投与量を増すとリボヌクレ

Table 1. Kinetic constants of the three frog proteins with dinucleoside phosphates at pH 5.5 and 20°C.<sup>22)</sup>

Substrate	cSBL <sup>a</sup>		jSBL <sup>a</sup>		cRNase <sup>a</sup>	
	K <sub>m</sub>	K <sub>cat</sub>	K <sub>m</sub>	K <sub>cat</sub>	K <sub>m</sub>	K <sub>cat</sub>
	(mM)	(min <sup>-1</sup> )	(mM)	(min <sup>-1</sup> )	(mM)	(min <sup>-1</sup> )
UpG	0.151	8,960	0.126	8,750	0.158	9,670
CpG	0.166	3,610	0.166	2,940	0.165	5,850
UpA	0.170	45	0.250	48	0.200	39
CpA	0.190	32	0.195	35	0.195	35
UpU	0.560	310	0.780	158	0.780	155
CpU	0.190	73	0.230	39	0.170	51
UpC	0.350	18	0.180	17	0.350	7.2
CpC	0.210	5.2	0.150	3.8	0.510	5.8

<sup>a</sup> cSBL, *Rana catesbeiana* sialic acid binding lectin; jSBL, *Rana japonica* sialic acid binding lectin; cRNase, *Rana catesbeiana* liver RNase.

アーゼとしての毒性も観察されている。onconase 単独よりも、他の抗癌剤との併用による相乗効果が認められ、現在 tamoxifen との併用により、第 III 相の臨床試験が行われている<sup>24)</sup>。

カエルリボヌクレアーゼの酵素活性は、耐熱性酵素であるということ以外にも、Table 1 に示したように、特に第二の塩基認識部位である B2 site の効果が他と異なるという特徴があり<sup>22)</sup>、立体構造上、RNase A とはかなりの相違があることが予想された。最近になって、ウシガエル卵由来のリボヌクレアーゼの立体構造が、X 線結晶解析<sup>25)</sup>と NMR<sup>26)</sup> で明らかになったが、B2 site 部分に十分な空間がないことが認められる。

4 種のリボヌクレアーゼは、互いに一次構造上の相同性も高く、酵素化学的性質も類似しているにもかかわらず、肝臓由来酵素には細胞成長阻害作用がないことは、類似した酵素の発現部位に応じた生理活性作用という面でも興味深いことである。さらに詳細な諸性質については、成書<sup>21)</sup>並びに総説<sup>25)</sup>に記載されている。

### 3. ウシガエル卵由来リボヌクレアーゼ（レクチン、cSBL と略す）の 2 量体形成反応

前述したように抗腫瘍作用を有するリボヌクレアーゼの内、ウシ精囊リボヌクレアーゼは 2 量体となっていることで抗腫瘍作用があることが分かっている。そこで、既にいくつかのリボヌクレアーゼでは 2 量体化の研究が報告されている。本稿では、既に抗腫瘍作用があるカエルリボヌクレアーゼについて 2 量体を作成した場合

に、効果がどうなるかを検討した結果を記述する。

#### 3-1. 他のリボヌクレアーゼの 2 量体化

現在までに、ウシ脾臓 RNase A、ヒト分泌型リボヌクレアーゼについて、2 量体化の研究がいくつか報告されている。大別すると、(1) 酢酸溶解後の凍結乾燥により、分子間架橋を含まない swapping dimer の形成<sup>27, 28)</sup>、(2) リジン残基の化学的架橋反応によって 2 量体を作成する方法<sup>29, 30)</sup>、(3) 遺伝子組換えによる改変体における分子間 S-S 架橋によって 2 量体を作成する方法<sup>31, 32)</sup>がある。いずれの報告においても、2 本鎖 RNA を加水分解する能力が高まり、腫瘍細胞の成長を阻害するようになっている。ウシ精囊リボヌクレアーゼと相同性の高い哺乳類リボヌクレアーゼの場合には、(1) のように、適当な条件におくことで、2 分子間の相互作用で安定な 4 次構造を形成し、その立体構造がウシ精囊リボヌクレアーゼと良く類似していることが分かっている<sup>30)</sup>。

#### 3-2. cSBL の 2 量体化<sup>33)</sup>

cSBL の天然型 2 量体の調製は、種々試みたが成功していない。そこで、dimethyl suberimidate を用いた Lys 残基間の架橋反応を試みた。

室温で約 1.3 倍当量の dimethyl suberimidate を加え 1 時間反応後、過剰のアミノニウムを加えて反応を停止させた。Mono S カラムで、反応物を分離精製し、SDS-PAGE で確認したところ、約 10% が 2 量体になっていた。2 量体架橋位置を確認するため、還元カルボキシメチル化後、1/400 のリシルエンドペプチダーゼで消化を行い、ODS カラムによる逆相 HPLC で分離し、

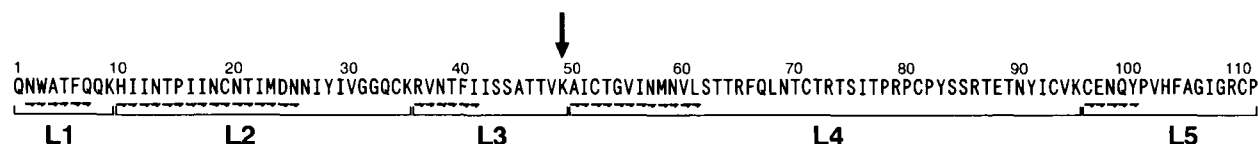


Fig. 2. Amino acid sequence of cSBL. L1-L5 indicated the peptides expected from the amino acid specificity of lysylendopeptidase. "→" indicated the amino acid sequence determined by Edman degradation. The vertical arrow indicated Lys49.

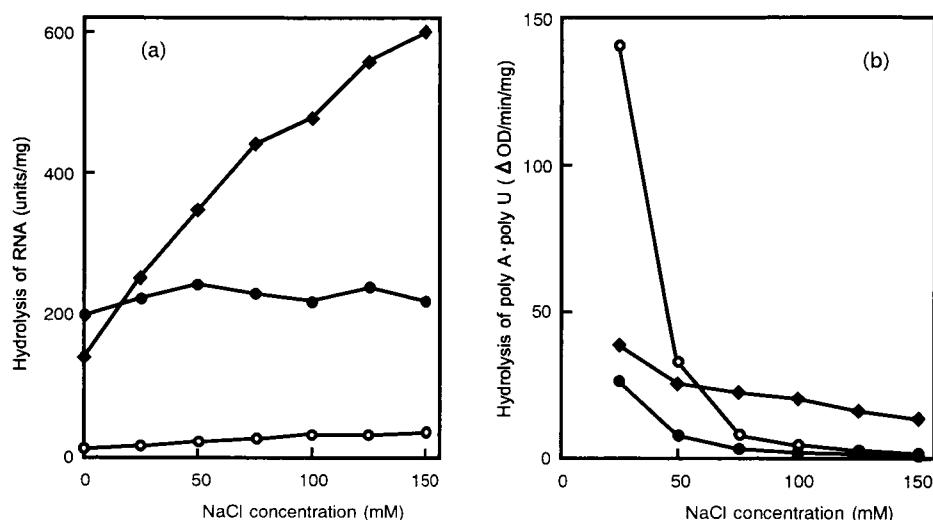


Fig. 3. Hydrolysis of single and double stranded RNAs. (a) Hydrolysis of yeast RNA. (b) Hydrolysis of poly A·poly U. RNase activity: cSBL, ●; cSBL-dimer, ○; bovine seminal RNase, ◆. The enzymatic activities were measured at pH 7.2 and NaCl at indicated concentration. The enzyme concentration was 0.6  $\mu$ g/ml.

ABI 491cLC プロテインシーケンサーでペプチド配列を確認した。同様の処理をした天然型 cSBL からペプチドと比較を行ったところ、cSBL2 量体では、Fig. 2 に示す cSBL の一次構造上、ペプチド L3 と L4 が消失していることが明らかとなった。これは、Lys49 が架橋されたことによりリシルエンドペプチダーゼ消化を受けなかったことを示し、本架橋反応は Lys49 同士の分子間架橋であると結論づけた。この架橋位置は、同じ架橋反応を行ったときのウシ膵臓 RNase A などでの Lys 31 (RNase A 番号)<sup>30)</sup>とは異なっている。cSBL にはこの付近に Lys 残基が存在していない。

### 3-3. cSBL2 量体の酵素化学的性質<sup>33)</sup>

cSBL2 量体の酵母 RNA (1 本鎖 RNA) に対する活性は、天然型の約 1/10 に低下していた。そこで、2 本鎖 RNA 分解活性を調べるため、poly A·poly U の加水分解活性をイオン強度を変えて測定した。ピリミジン塩基特異的な RNase A family 酵素では、2 本鎖中の poly U のみを加水分解するため、その反応は、260 nm の吸光度変化で追跡できる。その結果を Fig. 3 に示す。2 量体の 2 本鎖 RNA 分解活性は、天然型に比し 5 倍程度上昇していた。しかしながら同時に示したウシ精囊リボヌクレアーゼに較べると、イオン強度の影響が大きく、0.1 M 以上の NaCl 存在下ではほとんど 2 本鎖 RNA を分解しなかった。すなわち、cSBL は単量体でも 2 量体でも生理的イオン強度の条件下では 2 本鎖 RNA をほとんど加水分解しない。

### 3-4. cSBL2 量体の細胞成長阻害<sup>33)</sup>

マウス白血病 P388 細胞を用いて、2 量体化 cSBL による細胞成長阻害を調べた。常法に従って、P388 細胞を培養して、 $2 \times 10^5$  cells/ml に濃度を調節した細胞を、200  $\mu$ l ずつ 96 穴プレートに分注し、濃度を段階的に変

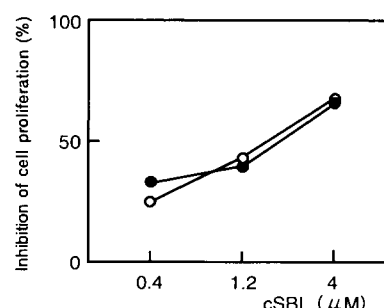


Fig. 4. Inhibition of P388 cell proliferation by cSBL (●) and cSBL-dimer (○) at the concentration indicated, measured at 48h incubation. Cell proliferation without adding cSBL was normalized to no inhibition.

えた cSBL を 10  $\mu$ l ずつ加えて、37°C、48 h インキュベート後、細胞数の増加を計数した。コントロールを 100% として、増加の阻害の割合を濃度に対してプロットした。この結果を Fig. 4 に示す。この結果、2 量体化 cSBL の細胞成長阻害は、天然型 cSBL と同程度であった。cSBL2 量体は、架橋位置が、活性中心の裏側にある Lys49 であるため、2 分子間の活性中心が遠く、ウシ精囊リボヌクレアーゼとは異なった架橋様式であることから、期待するほどの効果は得られなかったが、酵母 RNA 分解活性が低下しているにもかかわらず、細胞成長阻害活性を維持していることから、cSBL の細胞内取り込み、細胞内での反応機構解明に向けての有益な情報を得たと考えている。

### 4. cSBL のカルボジイミド修飾<sup>34)</sup>

仁田等は、cSBL をカルボジイミド修飾すると、抗腫瘍細胞作用が増強することを報告している<sup>21)</sup>。そこで、その詳細について検討した。

#### 4-1. カルボジイミド修飾の方法

酵素表面に存在するカルボキシル基は、大過剰のヌクレオフィル存在下に水溶性カルボジイミドと反応させると、通常、定量的にヌクレオフィルのアミノ基との間に脱水縮合が起こることが知られている。cSBLは2つのGluと1つのAsp残基を有している。仁田等の報告によれば<sup>21)</sup>、これらの内少なくとも一つのカルボキシル基側鎖は、シアル酸との結合を阻害する働きをしていると考えられる。そこで、ヌクレオフィル結合後の表面官能基を変えるために、ヌクレオフィルとして、タウリン、グリシンメチルエステルおよびエチレンジアミンを用い、1-ethyl-3(3-dimethyl-aminoethyl)-carbodiimide (EDC)と反応させた。反応は室温、pH 5.0で、0.25 mg/mlのcSBLに0.6 Mヌクレオフィルと40 mM EDCを加えて30分間反応後、大過剰の酢酸バッファーを加えて反応を停止させた。

#### 4-2. カルボジイミド修飾 cSBL の酵素活性<sup>34)</sup>

酵母RNA分解活性は、天然型cSBLに比して、タウリン、グリシンメチルエステル、エチレンジアミン導入酵素では、それぞれ87, 71, 36%に低下していた。poly A·poly Uを用いて、2本鎖RNA活性を測定したところ、Fig. 5に示すように、2量体化cSBLと同様、イオン強度の影響は強く受けるものの、2本鎖RNA分解活性の上昇が認められた。この現象については、予想外のことであり、今後さらに検討していく必要がある。

#### 4-3. カルボジイミド修飾 cSBL の細胞成長阻害<sup>34)</sup>

3-4と同様に、P388 cellによる細胞成長阻害を測定した。その結果をFig. 6に示す。カルボキシル基の代わりにアミノ基が結合しているエチレンジアミン導入

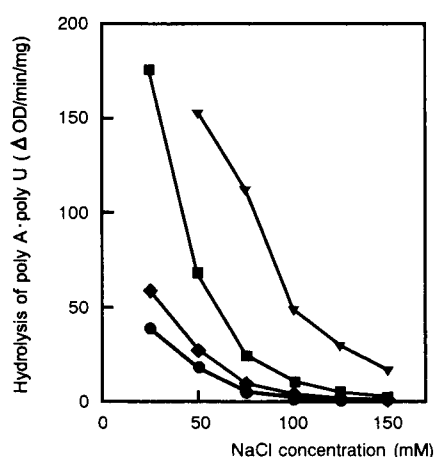


Fig. 5. Hydrolysis of poly A·poly U by native and modified cSBLs. cSBL, ●; cSBL modified by EDC with taurine (◆), glycine methyl ester (■), or ethylene diamine (▲). The enzymatic activities were measured at pH 7.2 and NaCl at indicated concentration. The enzyme concentration was 0.5  $\mu$ g/ml.

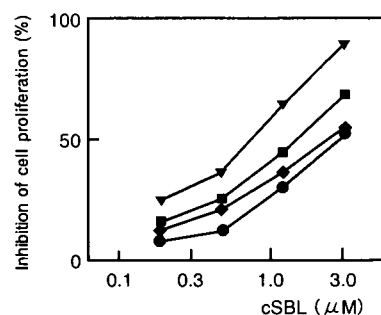


Fig. 6. Inhibition of P388 cell proliferation by native and modified cSBLs at the concentration indicated, measured at 48h incubation. Cell proliferation without adding cSBL was normalized to no inhibition. The symbols are same as in Fig. 5.

cSBLの成長阻害力が一番高く、同じ負荷電であるタウリンが天然型と最も近い値を示した。本結果からは、シアル酸結合能にとっては+荷電の増加が有利であることが推測されるが、+荷電の導入位置など、さらに検討が必要である。

#### 5. まとめと、これからの検討課題

ウシ膀胱のRNase Aに代表されるリボヌクレアーゼの中で、最下等動物のカエル由来酵素(cSBL)が、抗腫瘍作用を有することに着目して、作用機構の解明および作用増強を試みている。cSBLの2量体化は成功したが、細胞成長阻害作用には変化がなかった。酵素活性の低下から考えると、cSBLの細胞に対する作用機序解明に有用な情報となると考えている。また、カルボジイミド修飾をして、側鎖のカルボキシル基の-荷電を中性あるいは+荷電に変えることによって、細胞成長阻害作用が増強した。cSBLにはカルボキシル基を側鎖に含むアミノ酸残基は3つであり、現在これらアミノ酸残基の改変に着手している。cSBLの遺伝子組換え体の作成は、Huang等が既に報告している<sup>35)</sup>ため、今後、それぞれに着目する部位の改変体を用いての発表が続くと考えられる。一方、臨床試験に進んでいるonconaseは、類似酵素ではあるが、その細胞に対する作用機構はやや異なるようで、それぞれに独自の研究が進むと考えられる。

カエルのリボヌクレアーゼがこの様に抗腫瘍作用ということで着目されているため、次の新規酵素探索の目標は近縁動物、特に進化的に両生類の直前に位置する魚類になり、私共を含め複数の研究機関が既に魚類からの同種酵素の探索を開始している。魚類に限らずより下等な原索動物などの新口動物さらには旧口動物類から同種酵素を見出すことができれば、分子進化という観点、酵素活性の特異性、特殊な生理活性という面で有望な新規酵素となることが期待できるため、ぜひ早期に探索に成功したい。

## 謝 辞

本研究にあたって、平成 10 年度星薬科大学大谷記念

研究助成金（研究奨励金）を拝領いたしました。厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Irie, M. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 101-130
- 2) Irie, M. (1999) *Pharmacol. Ther.*, **81**, 77-89
- 3) Parry, S. K., Liu, Y., Clarke, A. E., Newbiggin, E. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 191-211
- 4) Wool, I. G. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 131-162
- 5) Beintema, J. J., Breukelman, H. J., Carsana, A., Furia, A. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 245-269
- 6) Iwama, M., Kunihiro, M., Ohgi, K., Irie, M. (1981) *J. Biochem.*, **89**, 1005-1016
- 7) Beintema, J. J., Hofsteenge, J., Iwama, M., Morita, T., Ohgi, K., Irie, M., Sugiyama, R. H., Schieven, G. L., Dekker, C. A., & Glitz, D. G. (1988) *Biochemistry*, **27**, 4530-4538
- 8) Rosenberg, H. F., Tenen, D. G., Ackerman, S. J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 4460-4464
- 9) Snyder, M. R., Gleich, G. J. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 425-444
- 10) Iwama, M., Sanda, A., Ohgi, K., Hofsteenge, J., & Irie, M. (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2133-2138
- 11) Sorrentino, S. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.*, 785-794
- 12) Riordan, J. F. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 445-489
- 13) Hayano, K., Iwama, M., Sakamoto, H., Watanabe, H., Sanda, A., Ohgi, K., Irie, M. (1993) *J. Biochem.*, **114**, 156-162
- 14) Zuao, W., Beintema, J. J., Hofsteenge, J. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **219**, 641-646
- 15) Beintema, J. J., Schuller, C., Irie, M., Carsana, A. (1988) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **51**, 165-192
- 16) Titani, K., Takio, K., Kuwada, M., Nitta, K., Sakakibara, F., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., Hakomori, S. (1987) *Biochemistry*, **26**, 2189-2194
- 17) Kamiya, Y., Oyama, F., Oyama, R., Sakakibara, F., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, G., Titani, K. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**, 139-143
- 18) Nitta, R., Katayama, N., Okabe, Y., Iwama, M., Watanabe, H., Ave, Y., Okazaki, T., Ohgi, K., Irie, M. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 729-735
- 19) Ardelt, W., Mikulski, S.M., Shogen, K. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 245-251
- 20) D'Alessio, G., Donatto, A. D., Mazzarella, L., Piccoli, R. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J. F., Academic Press, New York, pp. 383-423
- 21) Youle, R. J., D'Alessio, G. (1997) "Ribonucleases, Structure and Functions" eds by D'Alessio, G., Riordan, J.F., Academic Press, New York, pp. 491-514
- 22) Okabe, Y., Katayama, N., Iwama, M., Watanabe, H., Ohgi, K., Irie, M., Nitta, K., Kawauchi, H., Takayanagi, Y., Oyama, F., Titani, K., Abe, Y., Okazaki, T., Inokuchi, N., Koyama, T. (1991) *J. Biochem. (Tokyo)*, **109**, 786-790
- 23) Nitta, K., Takayanagi, G., Kawauchi, H., Hakomori, S. (1987) *Cancer, Res.*, **47**, 4877-4883
- 24) Deptala, A., Halicka, H. D., Ardelt, B., Ardelt, W., Mikulski, S. M., Shogen, K., Darzynkiewicz, Z. (1998) *Int. J. Oncol.*, **13**, 11-16
- 25) Irie, M., Nitta, K., Nonaka, T. (1998) *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 775-784
- 26) Chang, C. F., Chen, C., Chen, Y. C., Hom, K., Huang, R. F., Huang, T. H., (1998) *J. Mol. Biol.*, **283**, 231-44
- 27) Crestfield, A. M., Stein, W. H., Moore, S. (1962) *Arch. Biochem. Biophys. Suppl.*, **1**, 217-222
- 28) Gotte, G., Libonati, M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1386**, 106-112
- 29) Wang, D., Wilson, G., Moore, S. (1976) *Biochemistry*, **15**, 660-665
- 30) Liu, Y., Hart, P. J., Schlunegger, M. P., Eisenberg, D. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3437-3442
- 31) Vatzaki, E. H., Allen, S. C., Leonidas, D. D., Trautwein-Fritz, K., Stackhouse, J., Benner, S. A., Acharya, K.R. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **260**, 176-182
- 32) 野本貴史, 多田宏子, 二見淳一郎, 妹尾昌治, 山田秀徳 (1998) 第 71 回日本生化学会大会発表抄録集, pp. 827
- 33) 岩間正典, 小川裕子, 扇 和子, 辻 勉, 入江昌親 (1999) 日本薬学会第 119 年会 (徳島) 要旨集, **3**, 114
- 34) 岩間正典, 小川裕子, 佐々木のり子, 扇 和子, 辻 勉, 入江昌親, 仁田一雄, 高柳義男 (1999) 第 72 回日本生化学会大会発表抄録集, pp. 762
- 35) Huang, H. C., Wang, S. C., Leu, Y. J., Lu, S. C., Liao, Y. D. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 6395-6401